

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-295379

(43) 公開日 平成10年(1998)11月10日

(51) Int.Cl. <sup>a</sup>	識別記号	F I
C 12 N 15/09		C 12 N 15/00
A 61 K 35/76		A 61 K 35/76
48/00	ABD	48/00
	ADU	
C 07 K 19/00		C 07 K 19/00
		審査請求 未請求 請求項の数30 FD (全 8 頁) 最終頁に統く

(21) 出願番号 特願平10-126794  
(22) 出願日 平成10年(1998)4月21日  
(31) 優先権主張番号 19716892.2  
(32) 優先日 1997年4月22日  
(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

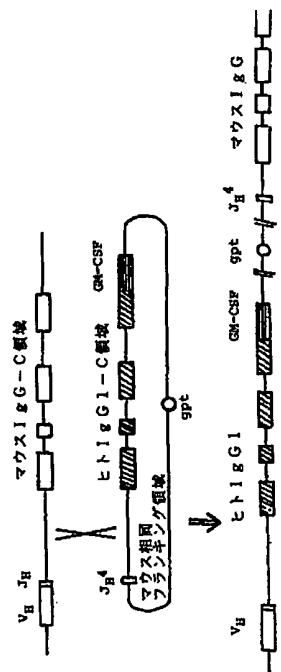
(71) 出願人 598060718  
ゲーエスエフ・フルム・フュア・ウンヴェルト・ウント・ゲズントハイト・ゲゼルシャフト・ミット・ペシュレンクテル・ハフツング  
ドイツ連邦共和国、デー 85764 オーバーシュライスハイム、インゴルシュテッタ・ラントシュトラーゼ 1  
(72) 発明者 ラルフ・モチカット  
ドイツ連邦共和国、デー 81369 ミュンヘン、ヨハン・クランツェ・シュトラーゼ 53  
(74) 代理人 弁理士 奥山 尚男 (外3名)

(54) 【発明の名称】 悪性B-細胞における免疫グロブリン-サイトカイン融合蛋白質の発現のためのベクター、その

(57) 【要約】 利用、発現方法

【課題】 ワクチンを個別に調製する必要がなく、患者に普遍的に使用できる新規なベクターを提供する。

【解決手段】 作用可能なように互いに結合された、  
(a)  $\mu$  イントロンまたは  $\kappa$  イントロンの領域と相同で、非機能性 C  $\mu$  または C  $\kappa$  エンハンサーを任意で含むか、あるいは欠失しているか、あるいは含む、少なくとも 1. 5 kb の領域と、(b) 免疫グロブリンまたはその一部のドメインをエンコードする少なくとも 1 つの DNA 配列と、(c) サイトカインをエンコードする DNA 配列と、(d) エンハンサーを任意で含むか、あるいは機能性エンハンサー領域を欠失しており、組み込みに統いて、マーカーの発現が細胞の C  $\mu$  または C  $\kappa$  エンハンサーにより調節される、真核 B-細胞において選択可能なマーカーとを少なくとも含む、悪性B-細胞における免疫グロブリン-サイトカイン融合蛋白質の発現のためのベクター。



**【特許請求の範囲】**

【請求項 1】 作用可能なように互いに結合された、  
(a)  $\mu$  イントロンまたは  $\kappa$  イントロンの領域と相同的少なくとも 1. 5 kb の領域と、(b) 免疫グロブリンまたはその一部のドメインをエンコードする少なくとも 1 つのDNA配列と、(c) サイトカインをエンコードするDNA配列と、(d) 真核B-細胞において選択可能で、機能性エンハンサー領域を含む、マーカー遺伝子とを少なくとも含む、悪性B-細胞における免疫グロブリン-サイトカイン融合蛋白質の発現のためのベクター。

【請求項 2】 前記少なくとも 1. 5 kb の領域が、機能性 C  $\mu$  または C  $\kappa$  エンハンサーを含む、請求項 1 記載のベクター。

【請求項 3】 前記少なくとも 1. 5 kb の領域が、非機能性 C  $\mu$  または C  $\kappa$  エンハンサーを含む、請求項 1 記載のベクター。

【請求項 4】 真核B-細胞において選択可能なマーカー遺伝子が、非機能性エンハンサー領域を含む、請求項 1 記載のベクター。

【請求項 5】 真核B-細胞において選択可能なマーカー遺伝子が、エンハンサー領域を欠失している、請求項 1 記載のベクター。

【請求項 6】 前記 (b) のDNA配列が、定常部またはその一部をエンコードする、請求項 1 記載のベクター。

【請求項 7】  $\mu$  または  $\kappa$  イントロンの C  $\mu$  または C  $\kappa$  エンハンサーから成る領域と相同的領域が、少なくとも 1. 9 kb から成る、請求項 1 記載のベクター。

【請求項 8】  $\mu$  または  $\kappa$  イントロンの C  $\mu$  または C  $\kappa$  エンハンサーから成る領域と相同的領域が、少なくとも 2. 0 kb から成る、請求項 1 記載のベクター。

【請求項 9】 前記ベクターが、細菌と適合する調節ユニットを含む、請求項 1 記載のベクター。

【請求項 10】 免疫グロブリンがキメラ免疫グロブリンである、請求項 1 記載のベクター。

【請求項 11】 前記 (b) のDNA配列が、ヒト免疫グロブリン鎖ドメインをエンコードする、請求項 1 記載のベクター。

【請求項 12】 前記 (b) のDNA配列が、マウス、ラット、ヤギ、ウマ、またはヒツジ由来のドメインをエンコードする、請求項 1 記載のベクター。

【請求項 13】 前記 (b) のDNA配列が、分泌抗体のCドメインを全てエンコードする、請求項 1 記載のベクター。

【請求項 14】 前記 (b) のDNA配列が、膜結合抗体のCドメインを全てエンコードする、請求項 1 記載のベクター。

【請求項 15】 前記 (c) のDNA配列が、インターロイキン、インターフェロン、コロニー刺激因子、リン

ホカインまたは成長因子をエンコードすることを特徴とする、請求項 1 記載のベクター。

【請求項 16】 前記 (c) のDNA配列が、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、IL-13、GM-CSF またはインターフェロン  $\gamma$  をエンコードすることを特徴とする、請求項 15 記載のベクター。

【請求項 17】 前記選択可能なマーカー遺伝子が、gp 130 またはヒグロマイシン耐性をエンコードするマーカー遺伝子である、請求項 1 記載のベクター。

【請求項 18】 (a) 請求項 1 記載のベクターを悪性B-細胞に導入する工程と、(b) 融合蛋白質を安定して発現する細胞を選択及び同定する工程と、(c) 細胞が複製能力を持たないようにするために細胞を処理する工程とを含む、in vitro で悪性B-細胞において免疫グロブリン-サイトカイン融合蛋白質を発現するための方法。

【請求項 19】 前記工程 (b) が省略される、請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】 前記工程 (a) がトランスフェクションにより実施される、請求項 18 または 19 記載の方 法。

【請求項 21】 前記トランスフェクションが、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム共同沈降、リボフェクション、DEAE デキストラン技術、またはレトロウイルス遺伝子転移により実施される、請求項 20 記載の方法。

【請求項 22】 選択剤としてミコフェノール酸、G 4 18 またはヒグロマイシンを含む培地において、前記選択が行われる、請求項 18 記載の方法。

【請求項 23】 相同の組み換えによる請求項 1 記載のベクターの導入後、悪性B-細胞の重鎖V遺伝子の前記ベクター 3' の部位特異的組み込みが行われる、請求項 18 記載の方法。

【請求項 24】 前記発現が、内因性 V<sub>H</sub> プロモーターにより調節される、請求項 18 記載の方法。

【請求項 25】 悪性B-細胞における免疫グロブリン-サイトカイン融合蛋白質の発現における、請求項 1 記載のベクターの利用。

【請求項 26】 悪性B-細胞が、B-細胞性白血病細胞、B-細胞性リンパ腫細胞またはプラズマ細胞腫細胞である、請求項 25 記載の利用。

【請求項 27】 免疫グロブリン-サイトカイン融合蛋白質の発現によって、T細胞の活性化が達成される、請求項 25 記載の利用。

【請求項 28】 悪性B-細胞性疾患者のワクチン接種のための悪性B-細胞における、請求項 1 記載のベクターの利用。

【請求項 29】 免疫グロブリン-サイトカイン融合蛋白質が細胞によって発現される、組み込まれた形態で請求項 1 記載のベクターを含む悪性B-細胞。

**【請求項 30】**複製不能にされ、組み込まれた形態で請求項1記載のベクターを含み、悪性B-細胞性疾患患者の治療において免疫グロブリンーサイトカイン融合蛋白質の発現が可能な、悪性B-細胞の利用。

**【発明の詳細な説明】**

**【0001】**

**【発明の属する技術分野】**本発明は、悪性B-細胞における免疫グロブリンーサイトカイン融合蛋白質発現のためのベクターと、悪性B-細胞における免疫グロブリンーサイトカイン融合蛋白質の発現方法と、前記ベクターと前記ベクターを含む悪性B-細胞の利用とに関する。

**【0002】**

**【従来の技術】**B-細胞性リンパ腫に発現される免疫グロブリンのイディオタイプ(idiotype)は、腫瘍特異抗原であるが、腫瘍を有する宿主において低い免疫原性を示す。イディオタイプI. a. に対する免疫反応を誘発するための幾つかの方法が評価されており、イディオタイプは、マウスにワクチン接種するための可溶性蛋白質として使用するために、GM-CSFに結合されている(Nature 362, 755-758, 1993)。GM-CSFは、専用の抗原提示細胞を補充することが可能で、イディオタイプの有効な提示と、従ってT細胞の活性化を引き起こす。この方法には、リンパ腫の免疫グロブリンV遺伝子をクローニングし、融合蛋白質を *in vitro* で生産し、精製しなくてはならないという欠点がある。従って、この方法では、臨床場面で患者毎に個別にワクチンを調製しなくてはならない。

**【0003】**

**【発明が解決しようとする課題】**本発明の目的は、ワクチンを個別に調製する必要がなく、患者に普遍的に使用できる新しいベクターを提供することにある。

**【0004】**

**【課題を解決するための手段】**この目的は、作用可能(operably)なように互いに結合された、(a)  $\mu$  イントロンまたは  $\kappa$  イントロンの領域と相同で、非機能性 C  $\mu$  または C  $\kappa$  エンハンサーを任意で含むか、あるいは欠失しているか、あるいは含む、少なくとも 1. 5 kb の領域と、(b) 免疫グロブリンまたはその一部のドメインをエンコードする少なくとも 1 つのDNA配列と、(c) サイトカインをエンコードするDNA配列と、(d) エンハンサーを任意で含むか、あるいは機能性エンハンサー領域を欠失しており、組み込み(integration)に統いて、マーカーの発現が細胞の C  $\mu$  または C  $\kappa$  エンハンサーにより調節される、真核B-細胞において選択可能なマーカーとを少なくとも含む、悪性B-細胞における免疫グロブリンーサイトカイン融合蛋白質の発現のためのベクターにより、本発明に従って解決された。

**【0005】**

**【発明の実施の形態】**本発明の好ましい態様は、従属形式の請求項、以下の説明および実施例から明らかとな

る。従来の技術、すなわち上記で引用された Nature 362, 755-758, 1993 の文献に示されている従来の技術に従って得られる融合蛋白質は、細胞培養細胞のトランسفエクション後に *in vitro* で発現され、精製され、可溶形態で投与されるが、一方本発明に従って提供されるベクターは、相同的組み換えによりサイトカイン遺伝子を免疫グロブリン遺伝子の重鎖の遺伝子座に部位特異的に挿入することが可能であり、その際、V 遺伝子を分離したり、その遺伝子をベクターに挿入する必要は全くない。予め精製された可溶性蛋白質を投与しなくてはならない従来の方法に対し、本発明のベクターは、悪性B-細胞に直接組み込まれ、この細胞内で発現が誘発され、その結果、遺伝子工学により改変された腫瘍細胞を直接患者に投与する事ができる。これは時間、労力、費用を節約するだけでなく、遙かに優れた腫瘍防御効果も引き起す。

**【0006】**本発明のベクター作製のための開始物質は、DE 44 06 512 に記載されている組み換え抗体の作製用の組み込みベクターであった。これらのベクターは、マウス/ヒトキメラ抗体を高率で生産するのに有用である。DE 44 06 512 に記載されている組み込みベクターは、組み換え抗体の調製にのみ役立ち、従って、抗体産生ハイブリドーマ細胞においてのみ発現された。悪性B-細胞において直接相同的組み換えによってサイトカインを有する融合細胞の形態で免疫グロブリンを発現し、悪性B-細胞性腫瘍を有する患者のワクチン接種のためにこの方法で修飾された悪性B-細胞を使用するという本発明の解決方法は、DE 44 06 512 から明らかではない。

**【0007】**本発明により、サイトカイン遺伝子は、相同的組み換えにより、例えばB-細胞性リンパ腫細胞の様な悪性B-細胞の免疫グロブリン重鎖遺伝子座に導入される。この目的のために、請求項1の特徴を有する組み込みベクターが作製された。重鎖遺伝子座への部位特異的組み込み後に、免疫グロブリンーサイトカイン融合蛋白質が、内因性 V<sub>H</sub> プロモーターの調節下に発現される。

**【0008】**記載されている組み換えベクターは、全てのリンパ腫に使用できる可能性がある。相同的組み換えにより悪性B-細胞の重鎖遺伝子座にサイトカイン遺伝子を導入することにより、イディオタイプの分離を回避できる。これによって、治療開始までの時間が大幅に短縮される。更に、融合蛋白質を精製せずに、ワクチン接種のために、放射線照射後の相同的組み換えにより修飾された腫瘍細胞を使用することも可能である。以下の実施例は、可溶性蛋白質の代わりに本発明に従って提供された修飾された細胞を使用して、ワクチン接種を実施すれば、腫瘍防御効果が極めて顕著となることを示している。

**【0009】**本発明によるベクターの作製は、DE 4

4 06 512に記載されている組み込みベクターに基づいている。本発明を完全に開示するために、このドイツ特許文書の全体は、引用することによって本明細書の一部とされる。しかし、DE 44 06 512に記載されている組み込みベクターは、組み換え抗体が発現も回収もされず、代わりに悪性B一細胞において直接発現される免疫グロブリン遺伝子とサイトカインの融合蛋白質が得られるように、本発明に従って修飾されている。

【0010】本発明のベクターは、イントロン領域と相同的の少なくとも1.5 kbの領域を有し、その領域には Igエンハンサーが、天然には存在しないか、あるいはその領域から欠失しているか、あるいはその領域において不活性化されており、あるいは更なる態様において、本発明のベクターは、機能性C $\mu$ またはC $\kappa$ エンハンサーを有している。

【0011】そのDNAは、抗体の機能性ドメインまたはその機能性部分をエンコードする限り、例えば1つ以上のエキソンを含んでよい。ドメインの機能性部分がVドメインの一部であるならば、これは標的抗原に結合できなくてはならないか、あるいは結合に寄与できなくてはならない。機能性部分がCドメインの一部であるならば、これはエフェクター機能の少なくとも一部を發揮できなくてはならない。

【0012】好ましい態様において、少なくとも1.5 kbの $\mu$ または $\kappa$ イントロンの領域は、C $\mu$ またはC $\kappa$ エンハンサーが配置される領域を含み、この領域は、機能性C $\mu$ またはC $\kappa$ エンハンサーを任意で含むか、あるいは欠失している。この後者の態様において、エンハンサーは、欠失しているか、あるいは不活性化されていてもよい。この様な不活性化は、例えば、従来技術から知られる方法による突然変異によって、起こすことができる。選択性マーカーにおいて、エンハンサーは欠失しているか、不活性化されている。別の態様において、マーカーは、天然のエンハンサーを欠失している。更なる態様において、選択性マーカーは、エンハンサーを含む。

【0013】前記ベクターに含まれる相同配列は、相同組み換えを達成するために少なくとも1.5 kbの長さを持たなくてはならない。この少なくとも1.5 kbのDNA配列は、C $\mu$ またはC $\kappa$ イントロンの異なる領域から選択できる。本発明に従って、エンハンサーそのものは、構築物に存在しなくとも、あるいは相同フランギング領域(homologous flanking region)から欠失しても、あるいはその中で不活性化されていてもよい。機能的に再配置された抗体遺伝子の相同配列へのベクターの組み込み時には、組み換え遺伝子の発現は、内因性(endogenous)エンハンサーの調節下にある。もし、定常部をエンコードするエキソンが挿入されると、これらは、更に内因性Vプロモーターの調節下に置かれる。更に、エ

ンハンサーは、選択性マーカーの発現を調節し、これによって、選択性マーカーが強力なエンハンサー付近に結合されている場合のみ活性化されることが保証される。使用された相同性部位により、免疫グロブリン座との相同組み換えが促進され、それによって選択性マーカーは、内因性C $\mu$ またはC $\kappa$ エンハンサーの調節下に置かれる。

【0014】免疫グロブリン-サイトカイン融合蛋白質をコードする本発明に従って提供される組み換え遺伝子の発現は、悪性B一細胞の重鎖V遺伝子の3'の部位特異的組み込み後、内因性V $H$ プロモーターにより調節される。クローニング技術は、従来の技術から本技術に精通する者にとって良く知られている。例えば、Sambrook et al., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2nd edition 1989, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, USA およびHarlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", 1988, Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, USAを参照されたい。

【0015】免疫グロブリンを産生するB細胞の内因性免疫グロブリンV遺伝子断片は変化しないで残り、導入された定常遺伝子断片とサイトカインに結合される相同組み換え後に発現される。この方法において、B一細胞リンパ腫のイディオタイプは保存されているが、そのサイトカインとの物理的結合によって、抗原提示細胞(antigen-presenting cells)による提示が増強され、これによってイディオタイプの免疫原性が増強される。従って、DE 44 06 512のベクターと対照的に、本発明のベクターはVドメインまたはその一部をエンコードしないが、代わりに内因性V配列をエンコードし、従って、トランスフェクションされたB一細胞のイディオタイプは保存される。

【0016】別的好ましい態様において、ベクターは、定常部またはその一部をエンコードするDNA配列を示す。この配列は、抗体の重鎖または軽鎖のいずれかをエンコードしていると思われる。全てのイディオタイプにおいて、幾つかのエキソンが重鎖をコードしていることは、精通した技術者に知られている。構築物に重鎖のC $H$ エキソンが1つだけ存在するならば、これは、好ましくはC $H_1$ エキソンである。この種の構築物により、F $a$  $b$ またはF $(a b)_2$ フラグメントの機能性を有する免疫グロブリン部分を持つ融合蛋白質を調製することが可能である。しかし、本発明のベクターは、好ましくは、完全な重鎖の発現を可能にする1種類の重鎖の全てのエキソンを含む。この態様において、要素(a)、(b)、(c)、および(d)は、5'-3'の方向にこの順番で配置されている。

【0017】本発明の組み込みベクターの別的好ましい態様において、 $\mu$ または $\kappa$ イントロンに相同な領域は、1.9 kbまたは2.0 kbの長さを持つ。更なる好ま

しい態様において、本発明のベクターは、細菌に適合する調節ユニットを含む。この様な細菌適合性調節ユニットは、細菌系、例えば、大腸菌におけるベクターのクローニングと増幅を可能にする。細菌適合性調節系は、上記の従来技術 (Sambrookら) から精通する技術者にとって知られている。前記細菌適合性調節ユニットの一具体例は、プラスミド pBR322 の調節ユニットである。

【0018】更なる態様において、融合蛋白質の免疫グロブリン部分は、キメラの性質を持つ。ここで、「キメラ」とは、異なる種のVおよびC領域を組み合わせた免疫グロブリンを意味する。例えば、マウスのV遺伝子は、ヒトのイソ型(isotype) のCエキソンと組み合わせる事ができる。別の態様において、前記特徴(b) のDNA配列は、ヒト免疫グロブリン鎖をエンコードする。このドメインは、VおよびCドメイン、あるいはその一部が可能である。

【0019】本発明のベクターの更なる好ましい態様において、DNA配列は、マウス、ラット、ヤギ、ウマまたはヒツジ由來のドメインをエンコードする。好ましくは、VまたはC領域をエンコードする配列のDNA配列は全て、前記動物種の1種に由来し、この場合、C領域は異なる動物種から得てもよい。本発明の有利な態様において、ベクターは、患者にとって異種であり、免疫反応の誘発に有利と思われる定常 Ig 領域を有する。

【0020】本発明のベクターの別の態様において使用されるヒトのドメインをエンコードするDNA配列に関して、相同組み換えのためのこれらのドメインをエンコードするDNA配列を、異なる哺乳動物種の対応する配列と共に使用する事ができる。本発明のベクターの別の好ましい態様において、DNA配列は、分泌抗体のCドメインの全てをエンコードする。

【0021】本発明のベクターの更なる好ましい態様は、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG4、IgA、IgDまたはIgE抗体のCドメインをエンコードするDNA配列を含む。これらのイソ型の幾つかが、全ての哺乳動物に存在しないことは、精通する技術者にとって良く知られている。例えば、ヒトゲノムは、IgG4イソ型をエンコードするが、IgG2aまたはIgG2bイソ型をエンコードしないC遺伝子を含む。これに反して、マウスゲノムは、IgG2a及びIgG2bイソ型をエンコードするが、IgG4イソ型をエンコードしないC遺伝子を含む。

【0022】本発明の組み込みベクターの更なる好ましい態様において、選択可能なマーカーは、gp t、neoまたはヒグロマイシン耐性のコードである。これらのマーカーに必要な選択的条件下に細胞を培養する方法は、精通する技術者にとって知られている (Sambrook ら、上記参照)。更に、精通する技術者は、本発明のベクターに使用できるその他の選択マーカーを選択できる。

【0023】免疫グロブリン産生細胞のトランスフェクションは、現代の免疫学において標準的方法と見なされている。トランスフェクションの条件は、使用される細胞系に関して調節しなくてはならないことは、精通する技術者にとって良く知られている。この様なトランスフェクションの条件を確立する基本的過程は、例えば、Tondeguzzo et al., Mol. Cell Biol. 6 (1986), 703-706 と Biorad "Genepulser" の説明に記載されている。マウス骨髄腫系 NS-1 (ATCC TIB 18) の適切なトランスフェクションの条件は、例えば、Mocikat et al., Gene 136 (1993), 349-353 に記載されている。安定な形質転換細胞の選択は、適切な選択培地で少なくとも 7 日間形質転換細胞を培養することにより行われる。適切な形質転換細胞の選択は、プラスミドを取り込まなかつた細胞を死滅させるために必要である。選択培地の選択は、もちろん、使用される選択マーカーに依存している。適切な選択培地の調製は、従来の技術から知られており、例えば、上記 Sambrook et al. に記載されている。

【0024】本発明の方法の好ましい態様において、トランスフェクションは、エレクトロポレーション (electroporation)、カルシウム共同沈降 (calcium co-precipitation)、リポフェクション (lipofection)、DEAE デキストラン法またはレトロウイルス遺伝子転移により行われる。これらの方法の全ては、従来の技術から良く知られている。従って、本発明の方法において各々のトランスフェクションの手順の諸条件を調節する方法は、精通する技術者にとって知られている。本発明の方法の別の好ましい態様において、選択剤としてミコフェノール酸、G418 またはヒグロマイシンを含む培地において、選択が行われる。上記の様に、これらの選択剤は従来の技術から良く知られている。それらの選択は、使用されるマーカーに依存しており、それらの投与量は、分子生物学の標準的教科書から求めることができる。上記 Sambrook et al. を参照されたい。

【0025】本発明の方法の別の好ましい態様において、DNA配列は、 $\gamma_1$ 、 $\gamma_{2a}$ 、 $\gamma_{2b}$ 、 $\gamma_3$ 、 $\gamma_4$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$  または  $\epsilon$  イソ型の定常ドメインをエンコードする。前記特徴(c) のDNA配列は、インターロイキン、インターフェロン、コロニー刺激因子、リンホカイン及び成長因子から選択されるサイトカインをエンコードする。この様なDNA配列の具体例は、IL-2、IL-4、IL-7、IL-12、IL-13、GM-CSF またはインターフェロン  $\gamma$  である。

【0026】本発明のベクターは、例えば、上記により詳細に特徴づけられている手順によって、悪性B-細胞の中に導入され、そこで、相同組み換えにより組み込まれ、安定して発現される。適切な選択および同定の手順により、安定して融合蛋白質を発現する悪性B-細胞が同定される。しかし、本発明の一態様において、融合蛋白質を発現する細胞が発見されると、その細胞を増殖させ、その細胞を用いて、本発明の方法により、他の細胞に組み込まれる。

白質を安定して発現する細胞を予め選択せずに、本発明のベクター構築物(vector construct)を含む悪性B-細胞をワクチン接種に直接使用する事も可能である。ワクチン接種の前に、融合蛋白質の発現に影響を与えることなく、放射線照射によって悪性B-細胞を複製不能とすることは、もちろん、必要である。

【0027】従って、患者に注入する前に組み換え細胞の選択を行うことは、必ずしも必要ではない。抗腫瘍免疫感作には、相同組み換えが発生した形質転換細胞の発現で十分なので、異種細胞集団の投与は許容される。このため、本発明のベクターにとって、請求項1の特徴

(d) に記載されている真核細胞において選択可能なマーカーを示すことは必ずしも必要ではない。患者に注入する前に、組み換え細胞の選択が行われない場合には、前記マーカーは省略できる。

【0028】本発明により提供されるベクターは、生体外分析においても使用できる。この目的のために、培養された樹状細胞を誘導して、腫瘍に特異的なペプチドを提示させ、また任意で、組み換え腫瘍細胞により発現される融合蛋白質によりT細胞を活性化させる。抗原提示細胞または活性化されたT細胞は、各々、その後、患者に再導入される。

【0029】免疫グロブリーン-サイトカイン融合蛋白質を生産する悪性B-細胞を注入する大きな利点は、臨床量のこれらの蛋白質を調製するために、長時間を要する生産および精製段階が不要となる点である。本発明のベクターが組み込まれた悪性B-細胞は、例えば、B-細胞性白血病細胞、B-細胞性リンパ腫細胞またはプラズマ細胞腫細胞である。

【0030】以下、動物モデルを使用して実施した実施例によって本発明を説明する。継続的な実験によれば、この方法で得られた結果は、ヒトにも応用できるであろう。本発明は、以下の実施例に限定されず、特許請求の範囲の記載内において変更も可能であることが理解されるべきである。

### 【0031】 【実施例】

#### ベクターの作製

ネズミGM-CSF遺伝子を、PstIによりpSP72(図3参照)の中にクローニングする。遺伝子の5'部分をEcoRVとXmaIにより切り取り、同じ酵素により切断されて、N-末端の29個のアミノ酸が欠失しているPCR生成物により置換する。この方法で、構築物pSP72(ΔEV)-GMCSF(ΔL)が調製される。ベクターpSvgpthuy1-A5(Kardinal et al., Eur. J. Immunol. 25, 792-797, 1995)の中で、SalI制限部位は、ヒトIgG1-C<sub>H</sub>3エキソンの導入された3'である。GM-CSF遺伝子は、SalIによりpSP72(ΔEV)-GMCSF(ΔL)から切断され、修飾されたpSvgpthuy1

-A5のSalI部位の中に結合される。

#### 【0032】遺伝子転移

GM-CSFを持つ組み換えベクターは、EcoRIまたはBamHIによって直線化され、ネズミB細胞リンパ腫細胞系MPC11の中に伝達される。ミコフェノール酸によりgp-t遺伝子の存在に関して、安定してトランسفェクションされた細胞が選択される。構築物が部位特異的方法で組み込まれたクローニング(図1参照)がELISAにより同定される。

#### 【0033】動物実験

抗腫瘍免疫感作のための相同組み換えによるリンパ腫イディオタイプの修飾の利点は、ネズミB細胞リンパ腫MPC11を用いて具体例として示される。この腫瘍はBALB/cマウスから得られ、IgG2bを発現し、10<sup>3</sup>個の細胞を同系動物に接種後20日以内までに動物の100%が死亡する。ベクターをMPC11に転移し、相同組み換え体を同定後、これらの組み換え体をBALB/cマウスの免疫感作に使用する。この目的のために、5×10<sup>6</sup>個の放射線照射された細胞をそれぞれ3週間の間隔で腹腔内投与する。最後の注入後7日に、致死量の野生型腫瘍細胞の接種材料を腹腔内投与する。腫瘍細胞だけを投与され、予め免疫感作されなかつた対照群の動物は腫瘍のため死亡し(図2のC群)、免疫感作された動物は生存に関して有意な利点を示す(A群)。相同組み換えにより重鎖遺伝子座の中にGM-CSF遺伝子を含まないヒトIgG1-C領域だけが導入された、すなわち異種重鎖を発現するMPC11細胞によりワクチン接種が実施されると、生存期間は僅かしか延長しない。

【0034】既述の方法において、リンパ腫からの腫瘍イディオタイプの単離は、遺伝子レベルでもタンパク質レベルでも不要であり、個体に特異的なワクチンを製造する必要がなく、共通のベクターをすべてのリンパ腫に利用することができ、治療開始までの時間を顕著に短縮することができる。相同組み換えによって修飾された、放射線照射された腫瘍細胞を利用すると、時間と労力を要する融合タンパク質の精製が不要となるという利点があるだけではない。顕著な利点は、組み換えタンパク質を発現する細胞を用いて免疫感作を行うと、精製可溶性タンパク質の投与と比較して、腫瘍防御効果が非常に強力であるということである。

【0035】本組み換えベクターによって、治療開始までの時間は、相当、短縮される可能性がある。さらに、融合タンパク質の精製を必要とせずに、ワクチン接種のための放射線照射後に、相同組み換えによって修飾した腫瘍細胞を利用することが可能である。上記の実施例によって、精製された可溶性タンパク質を用いた細胞の免疫感作と比較して、腫瘍防御効果が驚くほど強力であることが、証明されるであろう。

#### 【図面の簡単な説明】

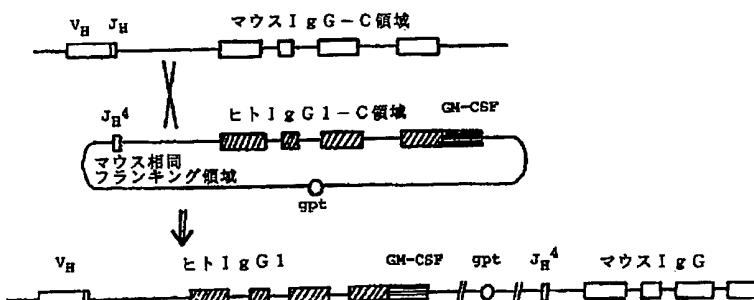
【図1】構築物が部位特異的方法で組み込まれて、クローンが得られることを示す図である。

【図2】腫瘍細胞の投与後の経過時間（日）と、生存率

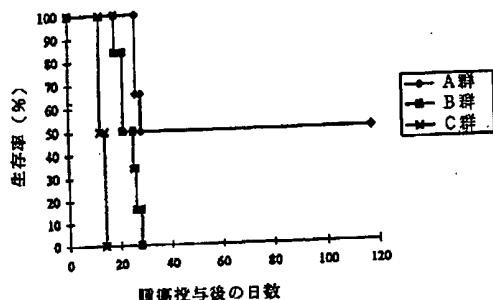
(%) の関係を示す図である。

【図3】ベクター pSP72 の制限酵素地図 (Promega, Medison, U.S.A.) である。

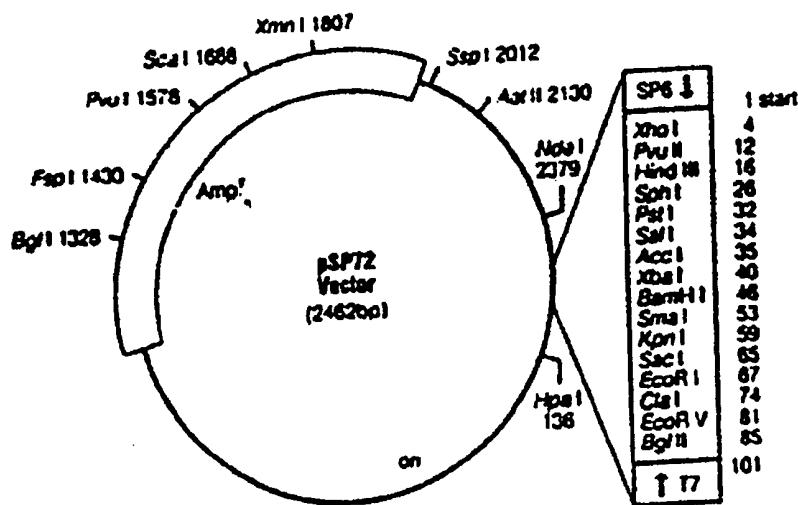
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I		
C 1 2 N	5/10	C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 P	21/02	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/53		33/574	D
	33/574	C 1 2 N	5/00	B
//(C 1 2 N	15/09			
C 1 2 R	1:91)			
(C 1 2 P	21/02			
C 1 2 R	1:91)			